

## 明 細 書

## キサントフィルの製造方法

## 技術分野

5       本発明は、キサントフィルの効率的な生産方法に関する。

## 背景技術

10       カロチノイドの一種であるキサントフィル（例えば、アスタキサンチン、  
カンタキサンチン、ゼアキサンチン、アドニルピン、アドニキサンチン、ク  
リプトキサンチンなど）は、種々の用途に使用されている。例えば、アスタ  
キサンチンは、赤色のカロチノイドの一種であり、強力な抗酸化作用を有す  
ることが知られている。そのため、食材用色素、化粧品、健康食品、医薬品  
などとして使用されている。アスタキサンチンは、化学合成されるものの他、  
天然物由来のものがある。天然物由来のアスタキサンチンは、オキアミ、ア  
マエビなどのエビ類、ファフィア酵母、藻類などから抽出されている。しか  
15       し、オキアミなどのエビ類あるいは酵母のアスタキサンチン含量は低いため、  
効率よくアスタキサンチンが抽出されない。

20       他方、藻類、例えば、ヘマトコッカスは、外部環境の変化に応じてシスト  
化し、藻体内にアスタキサンチンを蓄積する。そのため、藻類によるアスタ  
キサンチンの生産研究が行われている。

25       例えば、J. Fabregas et al., J. Biotech. Vol. 89, p66, (2001)には、  
ヘマトコッカスを２段階で培養し、アスタキサンチンを生産する方法が記載  
されている。この方法では、第１段階で、１日に１０～４０％の培養液を交  
換しながら（すなわち、半回分培養しながら）ヘマトコッカスの栄養細胞を  
得る。第２段階では、さらに１５日間、光を照射しながら回分培養を行い、  
栄養細胞の休眠細胞化（すなわち、シスト化）と細胞内部へのアスタキサン

チンの蓄積を誘発する。

R. T. Lorenz et al., TIBTECH, vol.18 (April), p160-167, (2000)には、アスタキサンチンの商業的生産のために、ヘマトコッカスの2段階培養方法が記載されている。この方法においては、第1段階で、密閉されたバイオリ  
5 アクター内で光照射しながらヘマトコッカスを培養して栄養細胞を得る。そして、次の第2段階では、この栄養細胞を、培地中の窒素とリンを欠乏させた屋外培養池に移し、培養池の温度を上昇させながら照射光の強度を上げて培養するか、屋外培養池の培地に塩化ナトリウムを添加して培養することにより、栄養細胞の休眠細胞化（すなわち、シスト化）と細胞内部へのアスタ  
10 キサンチンの蓄積を誘発する。

特開2000-60532号公報には、第1段階で、密閉されたバイオリアクター内で光照射しながらヘマトコッカスを培養して栄養細胞を得、そして、次の第2段階では、屋外培養池で休眠細胞に移行させてアスタキサンチンの生成、蓄積を誘発させ、ヘマトコッカスを捕食するあるいはヘマトコッ  
15 カスに寄生する生物が増殖する前に、ヘマトコッカスを回収する方法が記載されている。

しかし、上記のような2段階の反応においては、第2段階において、レースウェイ式大気開放型培養液などの開放または屋外培養池で培養を行う場合、培地に雑菌が増殖する可能性が高い。そのため、短期間にシスト化を行わな  
20 ければならず、シスト化細胞のアスタキサンチン含量も低い。アスタキサンチンの生産効率を高めるためには、大量の栄養細胞を準備しなければならない。

他方、特開2004-129504号公報には、暗所でもしくは光を照射しないで、かつ好氣的な条件下でヘマトコッカスを培養することにより、ア  
25 スタキサンチンを生産する方法が記載されているが、アスタキサンチンの生産性は低いという問題がある。

そこで、藻類からの効率的なアスタキサンチンの製造方法が望まれている。

#### 発明の開示

本発明は、光合成微細藻類からキサントフィルを製造する方法であって、

5      キサントフィルを含有する光合成微細藻類を栄養培地に接種して増殖させる工程；および、該増殖した微細藻類をシスト化させる工程を含む方法を提供する。

1      1つの実施形態では、上記キサントフィルを含有する光合成微細藻類が、シスト化された光合成微細藻類である

10      別の実施形態では、上記増殖工程およびシスト化工程が同一培養槽内で行なわれる。

また、別の実施形態では、上記微細藻類の増殖およびシスト化が、前記増殖工程およびシスト化工程が、低栄養培地を用いて行われる。

15      さらに別の実施形態では、上記増殖工程およびシスト化工程が回分培養で行われる。

さらに異なる実施形態では、上記増殖工程およびシスト化工程が、それぞれ異なる培地を用いて行なわれる。

別の実施態様では、上記増殖工程およびシスト化工程が、それぞれ回分培養で行なわれる。

20      また、一つの実施形態では、上記増殖工程およびシスト化工程が、光照射下で行われる。

さらに別の実施形態では、上記微細藻類がヘマトコッカス属に属する緑藻である。

25      また、別の実施形態では、上記緑藻がヘマトコッカス・プルビアリスである。

さらに異なる実施形態では、上記キサントフィルがアスタキサンチンであ

る。

また、本発明は、キサントフィルを含有する遊走子を有する光合成微細藻類を提供する。

## 5 図面の簡単な説明

図1は、栄養培地に接種するヘマトコッカスのシスト化細胞の顕微鏡写真である。

図2は、培養開始から50時間目のヘマトコッカス細胞の顕微鏡写真である。

10 図3は、培養開始から200時間目のヘマトコッカス細胞の顕微鏡写真である。

図4は、培養開始から350時間目のヘマトコッカス細胞の顕微鏡写真である。

15 図5は、本発明の1段階培養方法における、藻類の増殖およびアスタキサンチン含量の経時変化を示す図である。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、キサントフィルを含有する光合成微細藻類、好ましくはシスト化した光合成微細藻類を増殖培地に接種して増殖させ、ついで、シスト化させることを特徴とする。以下、本明細書において、光合成微細藻類を  
20 単に「微細藻類」ということがある。

キサントフィルを含有する微細藻類、好ましくはキサントフィルを多く蓄積した、シスト化した微細藻類を増殖培地に接種して増殖させた場合、シスト化した微細藻類は、キサントフィルを含有する遊走子を放出する。この遊  
25 走子がキサントフィルを含有したまま、栄養細胞となる。栄養細胞は、さらにキサントフィルを含有したまま、分裂によっても増殖する。従って、微細

藻類の数は、単純な細胞分裂による場合よりも、早く増加する。そして、この増殖（増加）した、キサントフィルを含有する微細藻類（栄養細胞）をさらにシスト化することにより、更なるキサントフィルが微細藻類内で、生産され、蓄積される。従って、本発明の方法でシスト化した微細藻類中には、  
5 もともと存在していたキサントフィルに加えて、新たに生産されたキサントフィルが含まれるので、単に微細藻類の栄養細胞からシスト化させた場合に比べて、キサントフィル含量が高くなる。以下、本発明について、詳細に説明する。

（光合成微細藻類）

10 本発明に用いられる光合成微細藻類としては、光合成をすることができ、かつキサントフィルを生産する能力がある藻類であれば、特に制限はない。緑藻類が、キサントフィル類の生産の点から、好ましく用いられる。

本発明に用いられる緑藻類としては、例えば、ヘマトコッカス (*Haematococcus*) 属に属する単細胞藻類が好ましく用いられる。好ましいヘマトコッカス属の藻類としては、ヘマトコッカス・プルビアリス (*H. pluvialis*)、ヘマトコッカス・ラクストリス (*H. lacustris*)、ヘマトコッカス・カペンシス (*H. capensis*)、ヘマトコッカス・ドロエバケンシ (*H. droebakensis*)、ヘマトコッカス・ジンバブエンシス (*H. zimbabweensis*) などが挙げられる。ヘマトコッカス・プルビアリス (*H. pluvialis*) としては、独立  
15 行政法人国立環境研究所に寄託されているNIES144株、米国テキサス大学藻類保存施設に寄託されているUTEX2505株、デンマークのコペンハーゲン大学のScandinavian Culture Center for Algae and Protozoa, Botanical Instituteに保存されているK0084株などが挙げられる。

ヘマトコッカス・ラクストリス (*H. lacustris*) としては、ATCCに寄託されているATCC30402株および同30453株、東京大学応用微生物研究所に寄託されているIAM C-392株、同C-393株、同C  
25

— 3 9 4 株および同 C — 3 3 9 株、あるいは U T E X 1 6 株および同 2 9 4 株などが挙げられる。

ヘマトコッカス・カペンシス (*H. capensis*) としては、U T E X L B 1 0 2 3 株などが挙げられる。

5       ヘマトコッカス・ドロエバケンシ (*H. droebakensis*) としては、U T E X 5 5 株が挙げられる。

ヘマトコッカス・ジンバブエンシス (*H. zimbabwiensis*) としては、U T E X L B 1 7 5 8 株などが挙げられる。

これらの中でも、ヘマトコッカス・プルビアリスが好ましく用いられる。

10       (シスト化)

本発明においては、上記微細藻類であって、キサントフィルを含有する微細藻類が、栄養培地に接種される。キサントフィルを含有する微細藻類には、キサントフィルを含有する栄養細胞およびシスト化した微細藻類が含まれる。キサントフィルを含有する微細藻類の栄養細胞は、その微細藻類が、かつて

15       シスト化していた（休眠状態にあった）ことを意味する。

微細藻類は、例えば、光照射、栄養飢餓状態、酸化物の存在など、生育環境からのストレスを受けると、細胞内にキサントフィルなどを蓄積し、休眠胞子化する。この休眠状態に入ることをシスト化という。本明細書では、シスト化は、休眠状態に入りキサントフィルを蓄積し始めた状態から完全にシ

20       スト化し休眠胞子となった状態までのいずれかの状態を含む。キサントフィル含量を高める観点からは、できるだけシスト化が進行し、キサントフィルを多く蓄積した微細藻類を用いることが好ましい。

(培地)

微細藻類の培養に用いる培地としては、特に制限がない。一般に、増殖に必要な窒素と、微量金属の無機塩（例えば、リン、カリウム、マグネシウム、鉄など）、ビタミン類（例えば、チアミンなど）などを含む培地が用いられ

25

る。例えば、VT培地、C培地、MC培地、MBM培地、MDM培地などの培地（これらは、藻類研究法 千原光雄・西澤一俊編、共立出版（1979）を参照のこと）、OHM培地（これは、非特許文献1を参照のこと）、BG-11培地およびこれらの改変培地などが用いられる。

- 5       これらの培地は、増殖を目的とする培地、シスト化を目的とする培地など、用途に応じて使用することができる。例えば、微細藻類の増殖を目的とする場合は、窒素源となる成分の多い培地（富栄養培地：窒素として、0.15 g/L以上を含む培地）を用いる。シスト化を目的とする場合は、窒素源となる成分をほとんど含まない培地（シスト化培地：窒素として、0.02 g/L未満）を用いる。あるいは、その中間の濃度の窒素源を含む培地（低栄養培地：窒素として、0.02 g/L以上で、0.15 g/L未満）を用いてもよい。
- 10

- 培地中の窒素源濃度、リン濃度などは、接種する微細藻類の量に依存して、決めればよい。例えば、培養開始時の微細藻類（ヘマトコッカス）の濃度が
- 15        $10^5$ オーダーの場合、低栄養培地を用いると、ある程度まで、微細藻類は増殖するが、窒素源の量が少ないため、増殖はすぐに止まる。このような場合、低栄養培地は、後述するように、一段階で（回分的に）増殖とシスト化を連続して行う場合に適した培地である。さらに、N/P比（モル比）を10～30に、好ましくは15～20に調整することにより、シスト化へスムーズに導くことができる。
- 20

      培養開始時の微細藻類の濃度がさらに高い場合、上記富栄養培地を用いて、上記培養を行うことができる。

      このように、培地の組成は、種々の条件を考慮して決定することができる。

- なお、本発明で用いる培地には、酢酸、グルコースなどの有機炭素源がほとんど含まれないため、長期間の培養でも、雑菌の混入はほとんどない。
- 25

      （培養装置）

微細藻類の培養装置は、二酸化炭素が供給でき、かつ培養液に光照射ができる装置であれば、特に制限はない。例えば、小スケールの場合は、扁平培養ビン、大スケールの場合は、ガラス製、プラスチック製などの透明板で構成された平板培養槽、照明器を備えた攪拌機付きのタンク型培養槽、チューブ型培養槽、エアドーム型培養槽、中空円筒型培養槽などが用いられる。また、密閉容器が好ましく用いられる。

#### (培養条件)

培養条件に特に制限はなく、一般に、微細藻類の培養に用いられる温度、pHが用いられる。微細藻類の培養は、例えば15～35℃で行われ、好ましくは20～25℃で行われる。培養中のpHは、6～8に保たれることが好ましい。二酸化炭素は、1～3 v/v %濃度の二酸化炭素を含有するガスを、例えば、0.2～2 v/v mとなるように吹き込むことで、供給される。平板培養槽を用いる場合、この二酸化炭素の供給により、培養液が攪拌され、微細藻類に対して光照射が均一に行われる。

#### (光照射)

微細藻類の培養においては、通常、光合成有効光量子束密度 (PPFD) を  $100 \mu\text{mol-photon}/\text{m}^2\text{s}$  (以下、単位を  $\mu\text{mol-p}/\text{m}^2\text{s}$  と略す) 程度となるように光を照射するが、キサントフィルの生成量を増加させる観点からは、 $300 \mu\text{mol-p}/\text{m}^2\text{s}$  以上であることが好ましく、 $500 \mu\text{mol-p}/\text{m}^2\text{s}$  以上であることがより好ましい。このようなPPFDが大きい光を培養開始時からシスト化までの培養過程全般に亘って照射することにより、アスタキサンチンの生産量が大きくなる。なお、PPFDは、LICOR-190SA平面光量子センサー (LICOR Inc., Lincoln, USA) を用いて、測定した光量子束密度であり、培地を入れていない培養装置の中央部にセンサーを配置し、光を照射して測定した値である。ガラス、アクリル樹脂などの透明板で構成された装置の場合、透

明板を通過してくるPPFDを測定し、所定のPPFDとなるように光の照度あるいは光源の距離を決定し、光源を配置すればよい。

(培養方法)

培養は、上記培地、培養装置、培養条件などを適宜選択して組合せ、照射下、行われる。培養方法には、2つの方法がある。一つは、シスト化した微細藻類を栄養培地に接種して増殖させ、シスト化させるまでを連続して、同一の培地で行う、1段階培養法である。他の一つは、シスト化した微細藻類を増殖させる培地とシスト化させる培地とを分離し、増殖とシスト化を別々に行う2段階培養法である。

1段階培養法は、シスト化した微細藻類を接種してから培養終了までの間、培地を交換することなく連続的に培養する方法である。すなわち、所定の培地で、同一培養槽内で、微細藻類の増殖およびシスト化を行う方法である。この1段階培養法は、連続培養には不向きであり、回分的に行われることが好ましい。この1段階培養法では、微細藻類はいったん増殖するが、培地中の栄養成分の消費による栄養飢餓ストレス、光照射によるストレス、高温による温度ストレス、塩化ナトリウムの添加によるストレスなどを受けて、増殖後、シスト化状態にスムーズに移行する。

キサントフィルを含有する微細藻類、好ましくはシスト化した微細藻類が栄養培地に接種されると、キサントフィルを含む遊走子を $2^n$ 個( $n=1\sim 4$ )放出する。この遊走子がキサントフィルを含んだまま栄養細胞となるので、キサントフィルを含む栄養細胞の数が増加する(微細藻類が増殖する)。さらに、栄養細胞は、細胞分裂により、増殖する。このキサントフィルを含有する栄養細胞をシスト化することにより、もともと有していたキサントフィルに加えて、新たにキサントフィルが蓄積されることから、キサントフィル含量が高められる。

ところで、栄養細胞が増殖を続けると、細胞内のキサントフィル濃度が低

下すると考えられるので、増殖は、キサントフィルが細胞内に残っている状態で停止させることが好ましい。

ある程度栄養細胞が増殖した時点で、微細藻類の増殖を停止させるためには、培地を栄養飢餓になるように設計することが好ましい。そのため、1段階培養法では、培地として、窒素源濃度が低い培地、例えば、上記低栄養培地が好ましく用いられる。接種するシスト化細胞の量が多い場合は、上記のように、窒素源濃度が高い培地、例えば、上記富栄養培地を用いてもよい。

なお、低栄養培地で微細藻類の生育が不十分である場合、富栄養培地あるいは低栄養培地を追加して、所望の濃度まで微細藻類を増殖させてもよい。

また、低栄養培地を用いる場合、N/P比（モル比）を10～30の間に調整しておく、増殖後スムーズにシスト化させることができる。

1段階培養法は、工程の管理が簡便であること、高濃度のキサントフィルを含有する微細藻類が簡便に得られること、別の培養槽に移し替える必要がないため、雑菌の混入が防止できること、培養槽が一つで済むことなどの利点がある。

2段階培養法は、シスト化した微細藻類を増殖させ、ついで、シスト化培地に移送して、シスト化を行う方法である。すなわち、2段階培養法では、まず、シスト化した微細藻類を富栄養培地または低栄養培地に、好ましくは富栄養培地に接種して微細藻類を増殖させる第1工程と、この微細藻類を回収して、窒素源をほとんど含まないシスト化培地に移行して、シスト化する第2工程からなる。

第1工程における微細藻類の増殖は、キサントフィルが栄養細胞に残存している間に終了させる必要があるため、栄養培地での培養は短時間で行われる。培養の開始時に富栄養培地を用いて培養すると、栄養細胞の増殖速度が、低栄養培地で培養した場合増殖速度よりも速いので、富栄養培地を用いることが好ましい。増殖終了後、微細藻類は回収され、シスト化培地に移し替え

られ、第2工程のシスト化が行われる。

この第1工程と第2工程は、それぞれ、別の培養槽で回分的に行ってもよい。第1工程終了後、増殖した微細藻類を洗浄、回収し、同一培養槽に戻して、第2工程を行ってもよい。

- 5       この2段階培養法でも、キサントフィル含量が高い微細細胞が得られる。この2段階培養法は、1段階培養法に比べて、増殖工程が短時間ですむという利点があるが、途中に増殖した微細藻類を移し替える操作が必要となる。

得られたシスト化微細藻類の一部はキサントフィルの回収に、残りの一部は、再度、栄養培地への接種のために用いてもよい。

- 10       (キサントフィルの回収)

微細藻類のシスト化により、キサントフィルが微細藻類内に蓄積されるので、藻類を回収後、常法により、キサントフィルを回収することができる。例えば、機械的に微細藻類を破壊した後、有機溶媒により抽出する方法が適用される。

15

#### (実施例)

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、この実施例が本発明を制限するものではない。

- 20       なお、この実施例において、クロロフィル、キサントフィル、および乾燥藻体を測定したが、その測定法は以下の通りである。

#### (クロロフィルの測定)

- 25       培養液を5ml採取し、遠心分離(3500rpm、5分)して、微細藻類を回収する。微細藻類をボルテックスして分散させ、ジメチルスルホキシド(DMSO)を5ml加えて分散して、30分間遮光静置した。その後、70℃の恒温槽で10分間、加熱処理し、遠心分離でDMSO画分を回収した。沈殿部分が着色している場合、さらにDMSOを5ml添加して、上記

操作を繰り返す。この操作は、細胞の色が白色になるまで、繰り返す。回収したDMSO画分を併せ、672nmの吸光度を、分光光度計（日立分光光度計U-3210）を用いて測定する。クロロフィルの濃度は、以下の式で求められる。

5      クロロフィル濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) =  $13.9 \times \text{希釈倍率} \times \text{吸光度}$

（キサントフィルの測定）

培養液を5ml採取し、遠心分離（3500rpm、5分）して、微細藻類を回収する。微細藻類をボルテックスして分散させ、5質量%のKOHを含む30（v/v）%メタノール水溶液を5ml加えて、緑藻をボルテックスし、分散させ、70℃の恒温水槽で10分間処理する。この処理により、クロロフィルが分解される。再度、遠心分離（3500rpm、5分）を行い、沈殿を回収する。ボルテックス後、酸（例えば酢酸）を用いて、残留アルカリを中和する。中和後、DMSOを5ml加え、20分間遮光静置し、  
10      さらに70℃で10分間、処理する。遠心分離（3500rpm、5分）により、上清を回収する。沈殿部分が着色している場合、さらにDMSOを5  
15      ml添加して、上記操作を繰り返す。この操作を細胞の色が白色になるまで、繰り返す。回収したDMSO画分を併せ、492nmの吸光度を測定する。キサントフィルの濃度は、以下の式で求められる。

20      キサントフィル濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) =  $4.5 \times \text{希釈倍率} \times \text{吸光度}$

なお、以下の実施例で使用するヘマトコッカス・プルビアリスが生産するキサントフィルは、ほとんどがアスタキサンチンである。上記キサントフィルの測定方法がアスタキサンチンの測定にも適用される。

（微細藻類の乾燥質量）

所定量の培養液を採取し、GC50ガラス繊維ろ紙（TOYO・ADVANTEC製）上で吸引濾過し、無機塩類を溶解するため、pH4の塩酸水溶液5mlで2回洗浄した。その後、ろ紙ごと、105℃の恒温乾燥機で3時間乾燥させ、真空デシケーター中で1時間、室温まで冷却し、乾燥質量を測定した。なお、GC50ガラス繊維ろ紙は、予め、上記恒温乾燥機で、105℃、1時間乾燥させて、その質量を測定しておいた。

（実施例1）

（前培養：増殖のためのシスト化細胞の取得）

キサントフィルのひとつであるアスタキサンチンを生産するヘマトコッカス・プルビアリスK0084株（以下、単にK0084株という）を用いた。1.5L、ライトパス25mmの密閉式扁平培養瓶に、以下の表1に示すMBG-11培地を1L入れ、初発の濃度が0.6g/LとなるようにK0084株を接種した。なお、MBG-11培地のN/P比は20である。

表1

MBG-11培地成分	g/L
KNO <sub>3</sub>	0.41
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.04
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.036
クエン酸(無水)	0.006
クエン酸鉄(III)アンモニウム	0.006
EDTA·2Na	0.001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00286
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.00181
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.00022
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.00008
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.000021
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.000000494

3容積%のCO<sub>2</sub>を含むガスを600ml/分の速度で（すなわち、0.6vvmで）通気しながら、培養温度25℃、pHを6～8の間で調整し、以下に示す光照射条件下で5日間培養した。

5 光照射は、光源として白色蛍光灯（National製、FL40SSW/37）を用いた。光照射の強度は、LICOR-190SA平面光量子センサーを用いて測定した培養槽受光方向のPPFDが100μmol-p/m<sup>2</sup>sとなるように、光照射の強度を調整した。

10 培養後のK0084株は、緑色から、茶色ないし茶褐色に変色しており、シスト化したことが確認された。このシスト化したK0084株は、乾燥質量あたり1.2%のアスタキサンチンを含有していた。この方法で得られた、栄養培地への接種に用いるシスト化細胞の顕微鏡写真を図1に示す。

（本培養：シスト化細胞の増殖および増殖した細胞のシスト化）

15 上記と同じ扁平培養瓶を用い、同じ培地（MBG-11培地）に、初発の濃度が0.6g/Lとなるようにシスト化したK0084株を接種し、上記と同じ培養条件で培養した。

20 培養の経過を、図1～4および図5を参照しながら説明する。培養開始時のK0084株は、図1に示すように褐色をしており、上記のように、アスタキサンチンの含有量は約1.2%であった。培養開始後、図5（c）および（d）に示すように、アスタキサンチンの含有率（乾燥藻体あたりのアスタキサンチン含量）はいったん低下するのに対して、クロロフィルの含有率（乾燥藻体あたりのクロロフィル量）は上昇する。そして、約50時間目からは、これが反転する。すなわち、50時間目以降、アスタキサンチンの含有率は上昇に転じ、クロロフィルの含有率は減少に転じる。この50時間目は、増殖が停止し、シスト化に転じる時期と思われる。

25 50時間目の細胞の顕微鏡写真を図2に示す。図2からわかるように、シスト化したヘマトコッカス細胞は、赤色を帯びた遊走子を含んでいる。この

遊走子が放出され、栄養細胞に変化していることもわかる。すなわち、遊走子から生じた細胞の細胞壁の内側にクロロフィルの蓄積と思われる緑色の層が見られた。

さらに培養を続けると、アスタキサンチン含有率は徐々に上昇し、クロロフィルは減少する。培養開始から200時間目の細胞の顕微鏡写真を図3に、350時間目の顕微鏡写真を図4に示す。200時間経過した図3の細胞は細胞のサイズが大きくなるとともに、細胞の内側に形成された緑層（クロロフィル層）のさらに内側に褐色のアスタキサンチンが蓄積していることがわかる。350時間目には、さらに細胞のサイズが増大し、細胞壁の内側が赤色の内容物で占められていることがわかる。これらの経過は、図5（A）の細胞濃度の経時的増加、図5（B）のアスタキサンチン濃度の経時的増加とよく一致する。350時間目の培養結果を表2に示す。

（比較例1）

K0084株のシスト化していない栄養細胞をMBG-11培地に接種したこと以外は実施例1と同様にして、350時間培養した。結果を表2に示す。

表2

	キサントフィル量	
	乾燥藻体あたり	培養液中濃度
	(wt/wt%)	(mg/l)
実施例1	1.8	80
比較例1	0.9	42

表2からわかるように、シスト化した微細藻類（ヘマトコッカス）を接種して増殖させ、シスト化させることにより、栄養細胞を接種して増殖させた場合に比べて、アスタキサンチンの濃度および含有率が高くなることがわ

かる。

(実施例 2)

シスト化した微細藻類を栄養培地で増殖させ、ついで、シスト化培地に移  
5 し替える 2 段階培養について、検討した。

以下の表 3 に示す培地を調製した。表 3 の BG-11 培地は、実施例 1 の  
1 段階培養に用いた MBG-11 培地の硝酸カリウム ( $\text{KNO}_3$ ) 0.41  
g の代わりに、硝酸ナトリウムを 1.5 g/L 含む富栄養培地である。一方、  
NBG-11 培地は、硝酸ナトリウムあるいは硝酸カリウムという窒素源を  
10 含まず、また、リンも含まない、シスト化培地である。

表 3

培地名	BG-11	NBG-11
成分	g/L	g/L
$\text{NaNO}_3$	1.5	0
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.04	0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	0.075
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.036	0.036
クエン酸(無水)	0.006	0.006
クエン酸鉄(III)アンモニウム	0.006	0.006
$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$	0.001	0.001
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	0.02	0.02
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00286	0.00286
$\text{H}_3\text{BO}_4$	0.00181	0.00181
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.00022	0.00022
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.00008	0.00008
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0.000021	0.000021
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.000000494	0.000000494

実施例 1 と同一条件で培養し、シスト化した K0084 株を回収し、洗浄  
25 して、表 3 の BG-11 培地 1 L に、初発の濃度が 0.6 g/L となるよう

に接種し、PPFDが $300\mu\text{mol-p/m}^2\text{s}$ となるように、光照射の強度を調整したこと以外は実施例1と同様の培養条件で、培養を開始した。

120時間（5日）後にK0084株を回収し、NBG-11培地（シスト化用培地）に接種して、同じ扁平培養瓶を用い、同じ培養条件でさらに培養を継続した。400時間培養後の結果を表4に示す。

（実施例3）

一方、培地としてMBG-11を用い、PPFDが $300\mu\text{mol-p/m}^2\text{s}$ となるように光照射の条件を調整したこと以外は実施例1と同様の培養条件で、シスト化細胞を接種して1段階で培養を行った。400時間培養後の結果を表4に示す。

（比較例2）

栄養細胞をBG-11培地に接種したこと以外は、実施例2と同様にして、2段階培養を行った。400時間培養後の結果を表4に示す。

表4

	培養方法	乾燥藻体量 (g/L)	キサントフィル量	
			含有率*1 (wt/wt%)	培養液中濃度 (mg/l)
実施例2	2段階培養	8.0	2.9	240
実施例3	1段階培養	7.8	3.5	270
比較例2	2段階培養	7.7	1.9	142

\*1) 乾燥藻体あたりのキサントフィル含量

この結果は、シスト化した微細藻類あるいはアスタキサンチンを含む微細藻類を増殖させ、シスト化させることにより、アスタキサンチン含量が高い微細藻類を得ることができることを示している。そして、1段階培養法および2段階培養法のいずれの方法も、アスタキサンチン含量の高い微細藻類を得る方法として、有用であることを示している。

### 産業上の利用可能性

- 5 本発明は、キサントフィルを含有する微細藻類、例えば、シスト化した微細藻類を接種して増殖させ、シスト化させることにより、キサントフィルを高濃度で含有する、シスト化した微細藻類が得られる。また、得られたシスト化した微細藻類の一部は、次の培養に用いられる。そのため、微細藻類による、効率的なキサントフィルの培養生産方法として、産業上有用である。

## 請求の範囲

1. 光合成微細藻類からキサントフィルを製造する方法であつて、  
キサントフィルを含有する光合成微細藻類を栄養培地に接種して増殖させる工程；および、該増殖した微細藻類をシスト化させる工程を含む、方法。  
5
2. 前記キサントフィルを含有する光合成微細藻類が、シスト化された光合成微細藻類である、請求項 1 に記載の方法。
- 10 3. 前記増殖工程およびシスト化工程が同一培養槽内で行なわれる、請求項 1 または 2 に記載の方法。
4. 前記増殖工程およびシスト化工程が、低栄養培地を用いて行われる、請求項 1 から 3 のいずれかの項に記載の方法。
- 15 5. 前記増殖工程およびシスト化工程が回分培養で行われる、請求項 1 から 4 のいずれかの項に記載の方法。
6. 前記増殖工程およびシスト化工程が、それぞれ異なる培地を用いて行な  
20 われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。
7. 前記増殖工程およびシスト化工程が、それぞれ回分培養で行なわれる、請求項 6 に記載の方法。
- 25 8. 前記増殖工程およびシスト化工程が、光照射下で行われる、請求項 1 から 7 のいずれかの項に記載の方法。

9. 前記微細藻類がヘマトコッカス属に属する緑藻である、請求項1から8のいずれかの項に記載の方法。

5      10. 前記緑藻がヘマトコッカス・プルビアリスである、請求項1から9のいずれかの項に記載の方法。

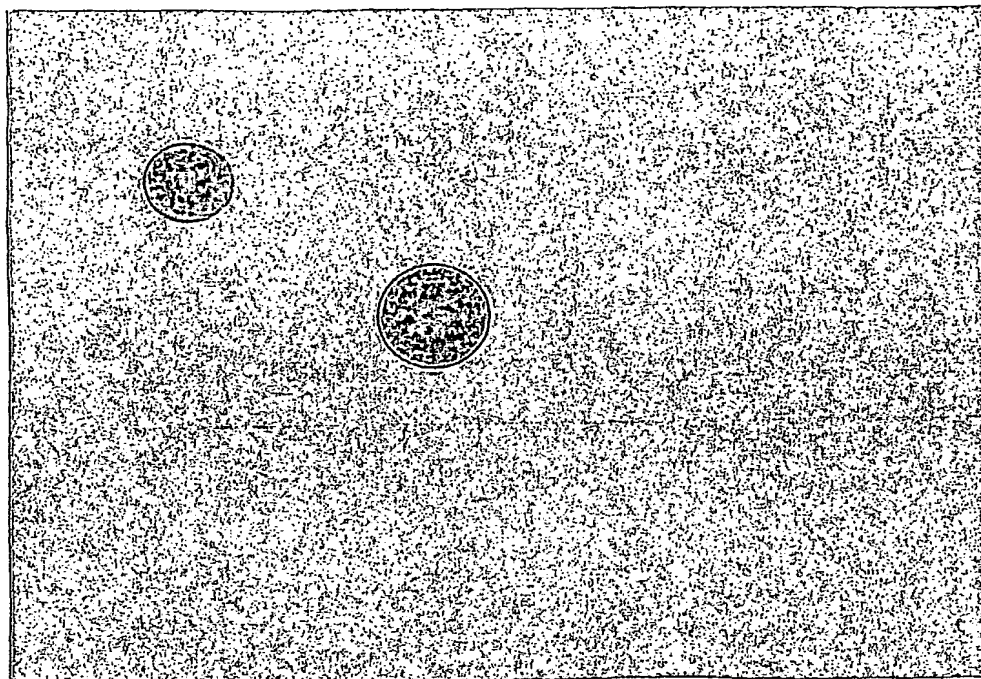
11. 前記キサントフィルがアスタキサンチンである、請求項1から10のいずれかの項に記載の方法。

10

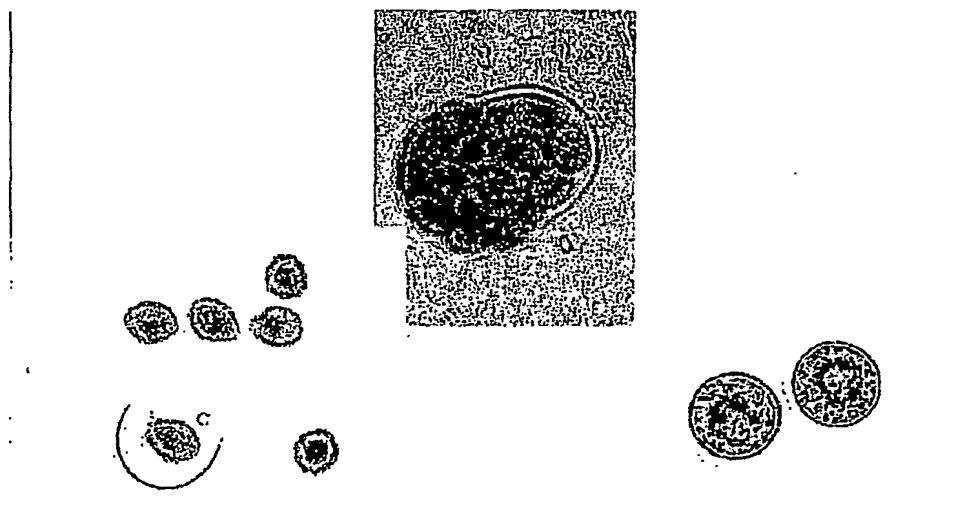
12. キサントフィルを含有する遊走子を有する光合成微細藻類。

1 / 3

第1図

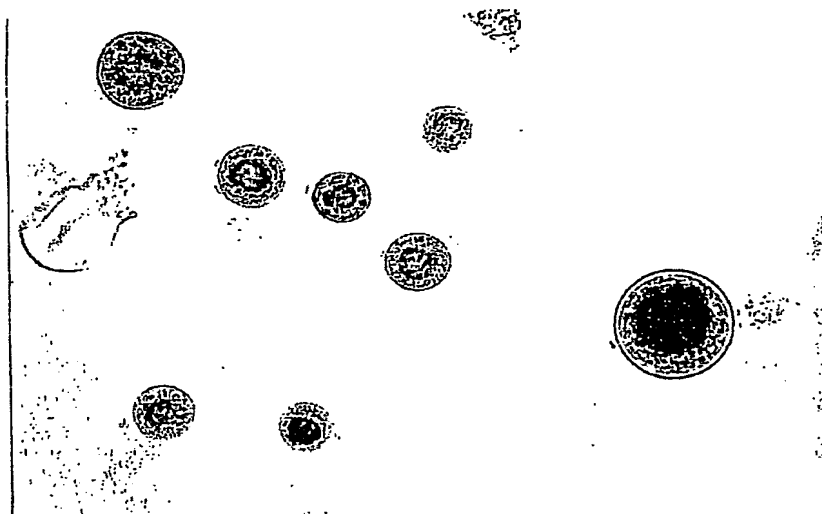


第2図

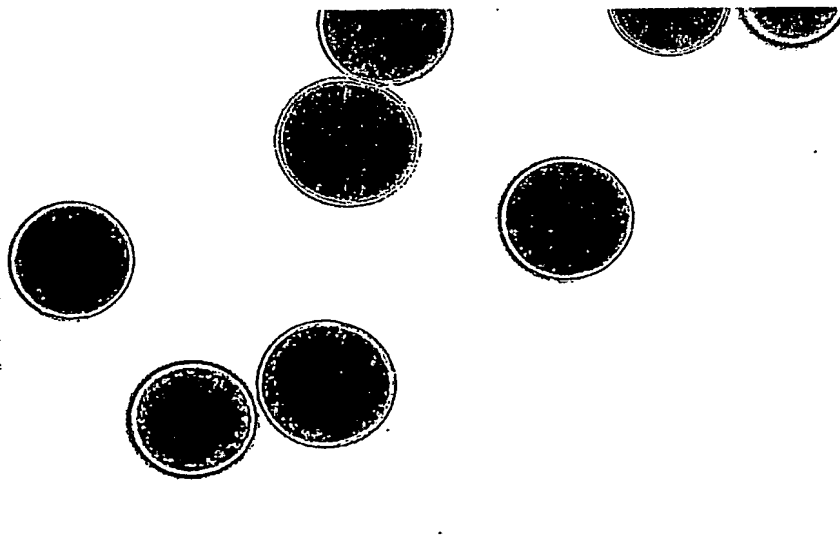


2 / 3

第3図

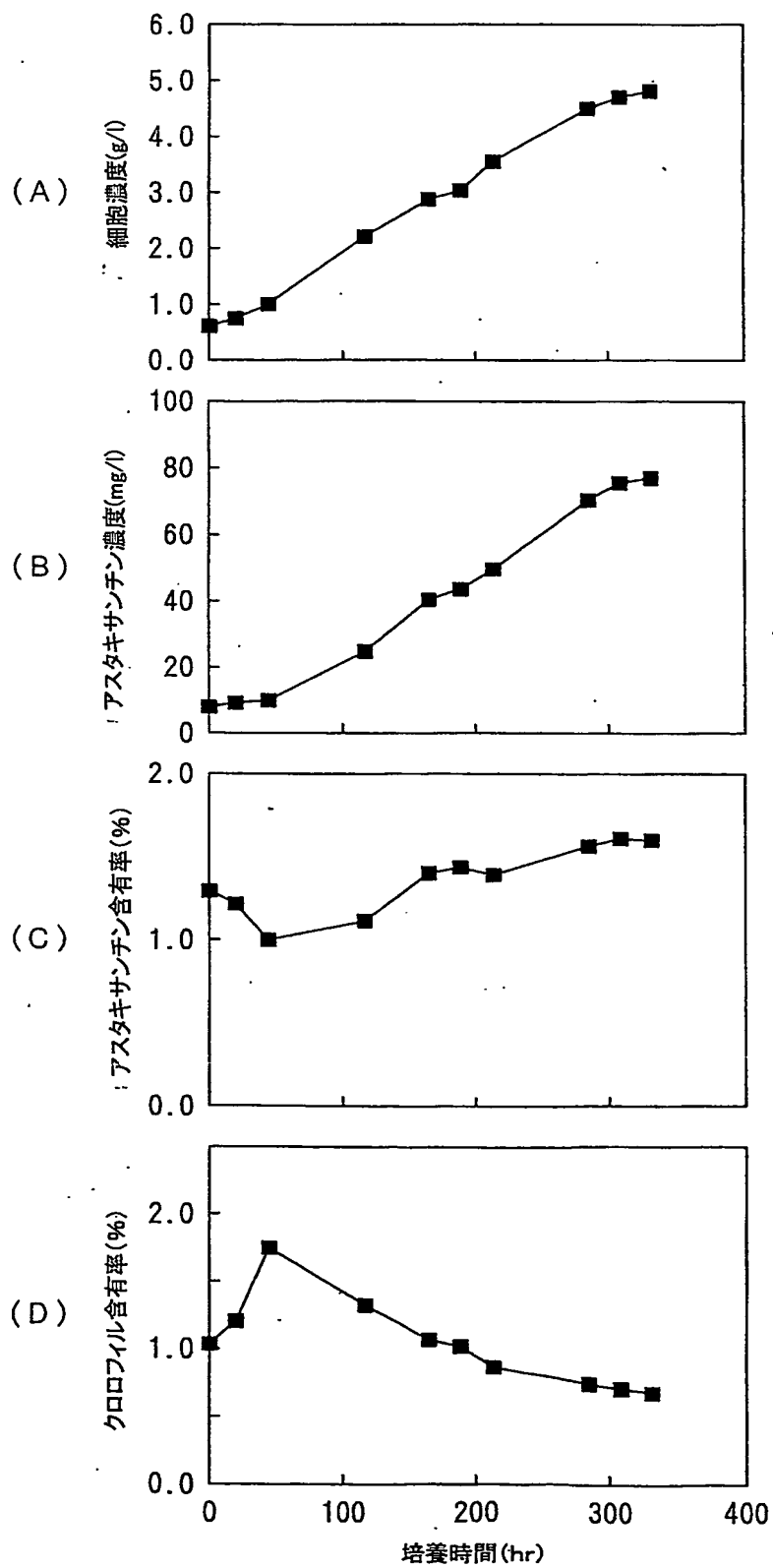


第4図



3 / 3

第5図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008274

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P23/00, C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P23/00, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Makio FURUBAYASHI et al., "Ryokuso Haematococcus pluvialis no Astaxanthin Seigosei ni okeru Hikari Izonsei", Seibutsu Kogakkaishi, 1993, Vol.71, No.4, pages 233 to 237	1,3-11 2
X A	JP 2001-61466 A (Higashimaru Shoyu Co., Ltd.), 13 March, 2001 (13.03.01), Claims; examples (Family: none)	1,3-11 2
X A	JP 7-39389 A (Higashimaru Shoyu Co., Ltd.), 10 February, 1995 (10.02.95), Claims; examples (Family: none)	1,3-11 2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July, 2005 (21.07.05)

Date of mailing of the international search report

09 August, 2005 (09.08.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008274

**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

There is no matter common to claims 1 to 12. Thus, the inventions as claimed in claims 1 to 12 are divided into those having a special technical feature common to the inventions as claimed in claims 1 to 11, i.e., "a method of producing xanthophyll from a photosynthetic microalga which comprises the step of inoculating a xanthophyll-containing photosynthetic microalga into an enriched medium and proliferating the same; and the step of making the thus proliferated microalga cystic" and the one having a special technical feature of the invention as claimed in claim 12, i.e., "a photosynthetic microalga having a zoospore containing xanthophyll". Accordingly, claims 1 to 12 have two general inventive concepts (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
Claims 1 to 11.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008274

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

including the general inventive concept relating to "a method of producing xanthophyll from a photosynthetic microalga which comprises the step of inoculating a xanthophyll-containing photosynthetic microalga into an enriched medium and proliferating the same; and the step of making the thus proliferated microalga cystic" as set forth in claims 1 to 11 and the general inventive concept relating to "a photosynthetic microalga having a zoospore containing xanthophyll" as set forth in claim 12. However, there is no novel special technical feature common to these general inventive concepts. Such being the case, it appears that the present application does not comply with the requirement of unity of invention (Enforcement of the Law Article 13 (PCT Rules 13.1, 13.2 and 13.3)).

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P23/00, C12N1/20

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.<sup>7</sup> C12P23/00, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Cplus(STN), JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	古林万木夫他, “緑藻 <i>Haematococcus pluvialis</i> のアスタキサンチン 生合成における光依存性”, 生物工学会誌, 1993, Vol. 71, No. 4, p. 233-237	1, 3-11 2
X A	JP 2001-61466 A(ヒガシマル醤油株式会社)2001. 03. 13, 特許請求の 範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1, 3-11 2
X A	JP 7-39389 A(ヒガシマル醤油株式会社)1995. 02. 10, 特許請求の範 囲, 実施例 (ファミリーなし)	1, 3-11 2

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 07. 2005

国際調査報告の発送日

09. 8. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4N

9739

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-12に共通の事項は存在しない。それ故、請求の範囲1-12に記載された発明は、請求の範囲1-11に記載される発明に共通する「光合成微細藻類からキサントフィルを製造する方法であって、キサントフィルを含有する光合成微細藻類を栄養培地に接種して増殖させる工程；および、該増殖した微細藻類をシスト化させる工程を含む、方法」に特別な技術的特徴を有するものと、請求の範囲12に記載される発明の「キサントフィルを含有する遊走子を有する光合成微細藻類」に特別な技術的特徴を有するもの分類される。してみれば、請求の範囲1-12には、請求の範囲1-11に記載される「光合成微細藻類からキサントフィルを製造する方法であって、キサントフィルを含有する光合成微細藻類を栄養培地に接種して増殖させる工程；および、該増殖した微細藻類をシスト化させる工程を含む、方法」に係る一般的発明概念と、請求の範囲12に記載される「キサントフィルを含有する遊走子を有する光合成微細藻類」の一般的発明概念との、2つの一般的発明概念が記載されているが、それぞれの一般的発明概念の間には、新規な特別の技術的特徴が共有されていないため、この出願は発明の単一性の要件（法施行規則第13条（PCT規則13.1、13.2及び13.3））を満たしていないと認める。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-11

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**